



Docket No.: N9460.0019/P019
(PATENT)

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re Patent Application of:
Kisaburo Deguchi et al.

Application No.: 10/715,385

Group Art Unit: Not Known

Filed: November 19, 2003

Examiner: Not Known

For: OLIGOSACCHARIDE SYNTHESIZER

CLAIM FOR PRIORITY

Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450

Dear Sir:

Applicants hereby claim priority under 35 U.S.C. § 119 based on the following prior foreign applications filed in the following foreign country on the dates indicated:

<u>Country</u>	<u>Application No.</u>	<u>Date</u>
Japan	2002-335940	November 20, 2002
Japan	2003-368259	October 29, 2003

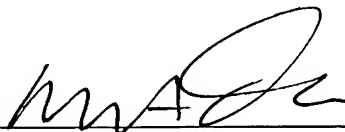
Application No.: 10/715,385

Docket No.: N9460.0019/P019

In support of this claim, a certified copy of each said original foreign application is being filed herewith.

Dated: January 15, 2004

Respectfully submitted,

By 

Mark J. Thronson

Registration No. 33,082

DICKSTEIN SHAPIRO MORIN &
OSHINSKY LLP

2101 L Street NW

Washington, DC 20037-1526

(202) 785-9700

Attorneys for Applicants



10/715 385
11-19-03

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this office.

Date of Application : November 20, 2002
Application Number : Patent Application No. 2002-335940
Applicant (s) : Hitachi High-Technologies Corporation

Dated this 5th day of December, 2003

Yasuo IMAI
Commissioner,
Patent Office

Certificate No. 2003-3100700

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日 2 0 0 2 年 1 1 月 2 0 日
Date of Application:

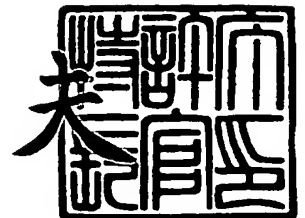
出 願 番 号 特 願 2 0 0 2 - 3 3 5 9 4 0
Application Number:
[ST. 10/C]: [J P 2 0 0 2 - 3 3 5 9 4 0]

出 願 人 株式会社日立ハイテクノロジーズ
Applicant(s):

2 0 0 3 年 1 2 月 5 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今 井 康 夫



【書類名】 特許願

【整理番号】 1102019991

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 G01N 30/00

【発明の名称】 糖鎖合成装置

【請求項の数】 2

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県ひたちなか市大字市毛 1 0 4 0 番地
株式会社 日立サイエンスシステムズ内

【氏名】 出口 喜三郎

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県ひたちなか市大字市毛 8 8 2 番地
株式会社 日立ハイテクノロジーズ
設計・製造統括本部 那珂事業所内

【氏名】 平田 源蔵

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県ひたちなか市大字市毛 8 8 2 番地
株式会社 日立ハイテクノロジーズ
設計・製造統括本部 那珂事業所内

【氏名】 伊藤 正人

【特許出願人】

【識別番号】 501387839

【氏名又は名称】 株式会社 日立ハイテクノロジーズ

【代理人】

【識別番号】 100075096

【弁理士】

【氏名又は名称】 作田 康夫

【電話番号】 03-3212-1111

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 糖鎖合成装置

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

バッファー液を送液するためのポンプと、糖ヌクレオチド溶液と糖転移酵素を混合し前記バッファー液の流れる流路に注入するサンプルインジェクターと、プライマーが固定化され、且つ前記サンプルインジェクターから溶出した溶液と前記プライマーとを反応させる反応槽と、糖転移酵素と未反応の糖ヌクレオチドおよび反応生成物であるヌクレオチドとを分離するための限外ろ過カラムと、当該限外ろ過カラムに接続され、且つ糖転移酵素と未反応の糖ヌクレオチドおよび反応生成物であるヌクレオチドの流れる流路を切替える第 1 のバルブと、当該第 1 のバルブからの糖転移酵素の流れる流路を切替える第 2 のバルブを有することを特徴とする糖鎖合成装置。

【請求項 2】

請求項 1 において、

前記バッファー液を保持する容器、前記ポンプ、前記反応槽及び前記限外ろ過カラムの間に各部間の流路を切替える第 3 のバルブを備え、

前記サンプルインジェクターによって注入された糖ヌクレオチド溶液と糖転移酵素の混合液が、前記反応槽ー前記第 3 のバルブー前記ポンプー前記サンプルインジェクターー前記反応槽と循環することが可能な流路を形成することを特徴とする糖鎖合成装置。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

糖鎖の合成、分離処理技術に係り、特に、これらの処理の自動化を図るための糖鎖合成装置に関する。

【0002】

【従来の技術】

細胞内における複合糖質は、情報伝達や細胞間の識別、例えば、ウイルス、が

ん細胞、血液型の認識等の重要な役割を果たしており、糖鎖の機能解明はポストゲノムの一つに位置付けられている。オリゴ核酸やペプチド合成法は、すでに確立され自動化されているが、糖鎖合成法は、まだ多くの課題を残している。

【0003】

糖鎖の機能解明に向けて、糖鎖合成法の確立と、効率的な合成装置の実現が望まれており、現在、以下に示す3つの糖鎖合成の方法が行われている。

- (1) 化学合成による方法
- (2) 遺伝子組換え細胞あるいは微生物による発酵法
- (3) 糖転移酵素を用いて合成する方法

前記(1)の方法は、化学結合させるOH基以外のOH基を保護しながら、目的とする糖鎖を順次合成するため、反応ステップが多く複雑になる。前記(2)の方法は、目的の糖鎖を大量に得ることができるが、その後の精製過程が複雑である。また、前記(3)の方法は、上記(1)、(2)の複雑さを克服する方法として開発されたものであり、例えば、特開平11-42096号公報に開示されたものである。この(3)の方法では、選択的な糖転移酵素による合成のため、(1)のようなOH基を保護する必要はない。また、副産物も少ないので、合成後の精製過程も容易である。

【0004】

糖鎖合成装置に関しては、特表平5-500905号公報に開示されたものがある。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】

上記(3)の方法を用いる糖鎖の合成を実際の装置を用いて実現する際、現在は、複数の糖を順次反応させるとき、各ステップ毎に、生成物の分離精製を行い、その後、次の反応に進むと云うバッチ方式で行われており、全ての処理を行うためには、必ず人の手を介していた。

【0006】

上記特表平5-500905号公報に開示されている装置では、反応させる糖の順序に応じて、反応カラムおよび分離精製手段を、シリーズに、連続的に連結

することが必要になる。即ち、反応させる糖が同じであっても、その数だけ反応カラムおよび分離精製手段も必要となり、装置が大掛かりなものになると云う問題がある。また、糖鎖合成を自動的に連続して行う方法が示されていない。

【0007】

本発明の目的は、複数の糖を順次反応させるとき、最小限の反応カラムと分離手段を用い、かつ、各ステップを連続的に行うことのできる糖鎖合成装置を提供することにある。

【0008】

【課題を解決するための手段】

上記目的における本発明の特徴は、種々の糖ヌクレオチド溶液と糖転移酵素を混合させた後に、プライマーを固定化した一つの反応槽（カラム）に導入することにより、プライマーに順次糖を化学結合させることが可能である。

【0009】

反応終了後に、糖転移酵素、未反応の糖ヌクレオチドおよび反応生成物であるヌクレオチドは、容易に反応槽から除去され、次の糖を結合させるための反応に移行できる。

【0010】

また、高価な糖転移酵素は、未反応の糖ヌクレオチドおよび反応生成物であるヌクレオチドと、限外ろ過カラムとそれに付随したバルブにより分離され、流路切替バルブを用いて再利用のために回収される。

【0011】

このように、混合、反応、分離の過程を繰り返し行いながら、種々の糖を順次結合させて目的の糖鎖を合成することができる。

【0012】

【発明の実施の形態】

〔実施例1〕

図1は、本実施例のシステム構成図である。

【0013】

糖鎖合成装置は、反応に最適なバッファー1とそれを送液するポンプ2、糖ヌ

クレオチド ($X-S_n$) 10~13 と糖転移酵素 (E_n) 14~17 を冷却保存し、またこれらを計量した後、混合する混合槽 4 を内蔵し、流路にその混合液を注入 (インジェクション) するサンプルインジェクター 3, 固定化プライマー (P) を内蔵した反応槽 5, 酵素と未反応の糖ヌクレオチド ($X-S_n$) および反応生成物であるヌクレオチド (X) を分子サイズによって分離するための限外ろ過カラム 6、およびそれに付随する 6 方バルブ 7, 限外ろ過後、酵素を回収するための流路切替バルブ 8 そして、これらを制御するコントローラ 9 により構成されている。

【0014】

本実施例では、糖転移酵素 (E_n) とは、例えば、ガラクトース転移酵素, N-アセチルグルコサミン転移酵素, N-アセチルガラクトサミン転移酵素, フコース転移酵素, シアル酸転移酵素, マンノース転移酵素等である。また、糖ヌクレオチド溶液 ($X-S_n$) とは、例えば、ウリジン-5'-ジホスホガラクトース, ウリジン-5'-ジホス-N-アセチルグルコサミン, ウリジン-5'-ジホス-N-アセチルガラクトサミン, グアノシン-5'-ジホスホフコース, グアノシン-5'-ジホスホマンノース, シチジン-5'-モノホスホ-N-アセチルノイラミン酸等である。また、固定化プライマー (P) とは、例えば、蛋白質, 糖蛋白質, 糖ペプチド, 脂質, 糖脂質, オリゴ糖, 多糖などの生体高分子や、特開平 11-42096 号公報に記載されているポリアクリルアミド誘導体等の合成高分子が、ある固層担体に固定されたものである。また、これを内蔵したものが反応槽である。

【0015】

図 1 は、本実施例の流路図でもある。図 1 に基づき本装置の動作を説明する。ここでは、プライマー P と糖 S_1 , S_2 , S_3 は、 $P-S_1-S_2-S_3$ の順序で反応させるものと仮定する。しかし、実際には、糖 S_1 , S_2 , S_3 の順序には制限はない。

【0016】

$P-S_1-S_2-S_3$ の順序で反応させる場合、反応温度, 反応時間を除いて、基本的には次の 5 ステップを 3 回繰り返す。

【0017】

S₁, S₂, S₃ の各反応の違いは、それぞれに最適な反応温度、反応時間が設定されることである。また、それぞれの反応で最適なバッファーが必要な場合は、バッファー 1 を複数備え、且つバッファーの選択が可能な低圧グラジエント機能付きポンプを用いることにより、容易に実現できる。

ステップ 1:

バッファー 1 をポンプ 2 により一定流量で流し、流路系の洗浄を行う。6 方バルブ 7, 流路切替バルブ 8 はドレイン位置にし、装置の初期化を行う。この時、サンプルインジェクター 3 内部の洗浄, 反応槽 5 の温度の設定も行う。

ステップ 2:

サンプルインジェクター 3 において、一定量の糖ヌクレオチド (X-S 1) 10 とその酵素 (E 1) 14 を計量し、混合槽 4 で混合した後、その混合液を流路に注入する。

ステップ 3:

上記混合液をプライマー (P) を固定化した反応槽 (カラム) 5 に導入し、一定温度で、一定時間反応させる。この時、ポンプ 2 の流量は一定またはゼロである。ポンプ流量の設定で注意すべき点は、反応時間内に、糖ヌクレオチド (X-S 1) 10 とその酵素 (E 1) が反応槽 5 から流出してしまわないようにすることである。

ステップ 4:

反応終了後、酵素 (E 1) 14 と未反応の糖ヌクレオチド (X-S 1) 10 および反応生成物であるヌクレオチド (X) を限外ろ過カラム 6 に導き、一定時間送液し分離する。

【0018】

この時、6 方バルブ 7 は図 1 の実線で示した流路になっているので、ろ過された未反応の糖ヌクレオチド (X-S 1) 10 および反応生成物であるヌクレオチド (X) は、ドレインに流れ、酵素 (E 1) 14 は、限外ろ過カラム 6 内に残っている。

ステップ 5:

分離後、6方バルブ7を図1の点線の流路に切替えて、限外ろ過カラム中に残った酵素(E1)を流路切替バルブ8側に流す。流路切替バルブ8では、酵素(E1)用ボトルに接続された流路に切替えられ、酵素(E1)が捕集され保存される。

【0019】

上記の各ステップを糖ヌクレオチド($X-S_n$)と酵素(E_n)を替えながら繰り返すことで、反応槽5内のプライマー(P)に、導入された糖(S_n)が順に接続され糖鎖が合成される。

【0020】

全反応終了後に、合成された糖鎖を固相担体から切り出すには、そのための酵素が必要である。切り出し用の酵素をサンプルインジェクター3から導入し、一定時間、反応槽5内で反応させる。その後、限外ろ過カラム6で、切り出し用の酵素と分離し、6方バルブ7のドレイン側で、合成された糖鎖($S_0-S_1-S_2-S_3$)を捕集する。

【0021】

ここで、 S_0 はプライマー(P)に最初に付いていた糖である。

【0022】

〔実施例2〕

図2は、本実施例のシステム構成図である。

【0023】

糖鎖合成装置は、反応に最適なバッファー1とそれを送液するポンプ2、糖ヌクレオチド($X-S_n$)10~13と糖転移酵素(E_n)14~17を冷却保存し、またこれらを計量した後、混合する混合槽4を内蔵し、流路にその混合液を注入(インジェクション)するサンプルインジェクター3、固定化プライマー(P)を内蔵した反応槽5、反応槽5から流出してきた溶液をポンプ2の吸引口に戻すためのリサイクル6方バルブ18、溶液を一端トラップするための密閉されたトラップボトル19、酵素と未反応の糖ヌクレオチド($X-S_n$)および反応生成物であるヌクレオチド(X)を分離するための限外ろ過カラム6、およびそれに付随する6方バルブ7、限外ろ過後、酵素を回収するための流路切替バル

ブ 8、そして、これらを制御するコントローラ 9 により構成されている。

【0024】

図 2 は、本実施例の流路図でもある。図 2 に基づき本装置の動作を説明する。

【0025】

ここでは、プライマー P と糖 S_1 , S_2 , S_3 は、 $P-S_1-S_2-S_3$ の順序で反応させるものと仮定する。しかし、実際には、糖 S_1 , S_2 , S_3 の順序には制限はない。

【0026】

$P-S_1-S_2-S_3$ の順序で反応させる場合、反応温度、反応時間を除いて、基本的には次の 5 ステップを 3 回繰り返す。

ステップ 1:

バッファ 1 をポンプ 2 により一定流量で流し、流路系の洗浄を行う。6 方バルブ 7、流路切替バルブ 8 はドレイン位置に、また、リサイクル 6 方バルブ 18 は、実線の流路で装置の初期化を行う。この時、サンプルインジェクター 3 内部の洗浄、反応槽 5 の温度の設定も行う。

ステップ 2:

一定量の糖ヌクレオチド ($X-S_1$) 10 とその酵素 (E_1) 14 を計量し、混合槽 4 で混合した後、その混合液をサンプルインジェクター 3 により流路に注入する。

ステップ 3:

上記混合液をプライマー (P) を固定化した反応槽 (カラム) 5 に導入し、一定温度で、一定時間反応させる。この時、ポンプ 2 の流量は一定とし、リサイクル 6 方バルブ 18 を切替えて点線で示す流路とする。

【0027】

従って、注入された糖ヌクレオチド ($X-S_1$) 10 とその酵素 (E_1) 14 は、反応時間の間、繰り返し反応槽 5 を通過することになる。

ステップ 4:

反応終了後、リサイクル 6 方バルブ 18 を実線で示す流路に戻した後、酵素 (E_1) 14 と未反応の糖ヌクレオチド ($X-S_1$) 10 および反応生成物であ

るヌクレオチド (X) を限外ろ過カラム 6 に導き、一定時間送液し分離する。

【0028】

この時、6 方バルブ 7 は図 1 の実線で示した流路になっているので、ろ過された未反応の糖ヌクレオチド (X-S1) 10 および反応生成物であるヌクレオチド (X) は、ドレインに流れ、酵素 (E1) 14 は、限外ろ過カラム 6 内に残っている。

ステップ 5:

分離後、6 方バルブ 7 を図 2 の点線の流路に切替えて、限外ろ過カラム中に残った酵素 (E1) を流路切替バルブ 8 側に流す。流路切替バルブ 8 では、酵素 (E1) 用ボトルに接続された流路に切替えられ、酵素 (E1) が捕集され保存される。

【0029】

全反応終了後の合成された糖鎖 ($S_0-S_1-S_2-S_3$) の固相担体からの切り出し、捕集の方法は、実施例 1 と同じである。

【0030】

実施例 1 との違いは、ステップ 3 である。本実施例では、注入された糖ヌクレオチドと酵素が、一定流量で繰り返し反応槽を流れるため、良く攪拌され、反応が促進されると言った効果がある。また、上記実施例 1 での注意すべき点、つまり、反応時間と流量の関係についても、不要となるため操作も容易となると言った効果もある。

【0031】

【発明の効果】

本発明によれば、種々の糖転移酵素と糖ヌクレオチドを反応槽と分離カラムを通過させることにより、複雑な糖鎖合成であっても連続的、且つ自動的に実行することが可能になる。

【0032】

また、糖転移酵素も回収することが可能になる。

【図面の簡単な説明】

【図 1】

実施例 1 のシステム構成図および流路図である。

【図 2】

実施例 2 のシステム構成図および流路図である。

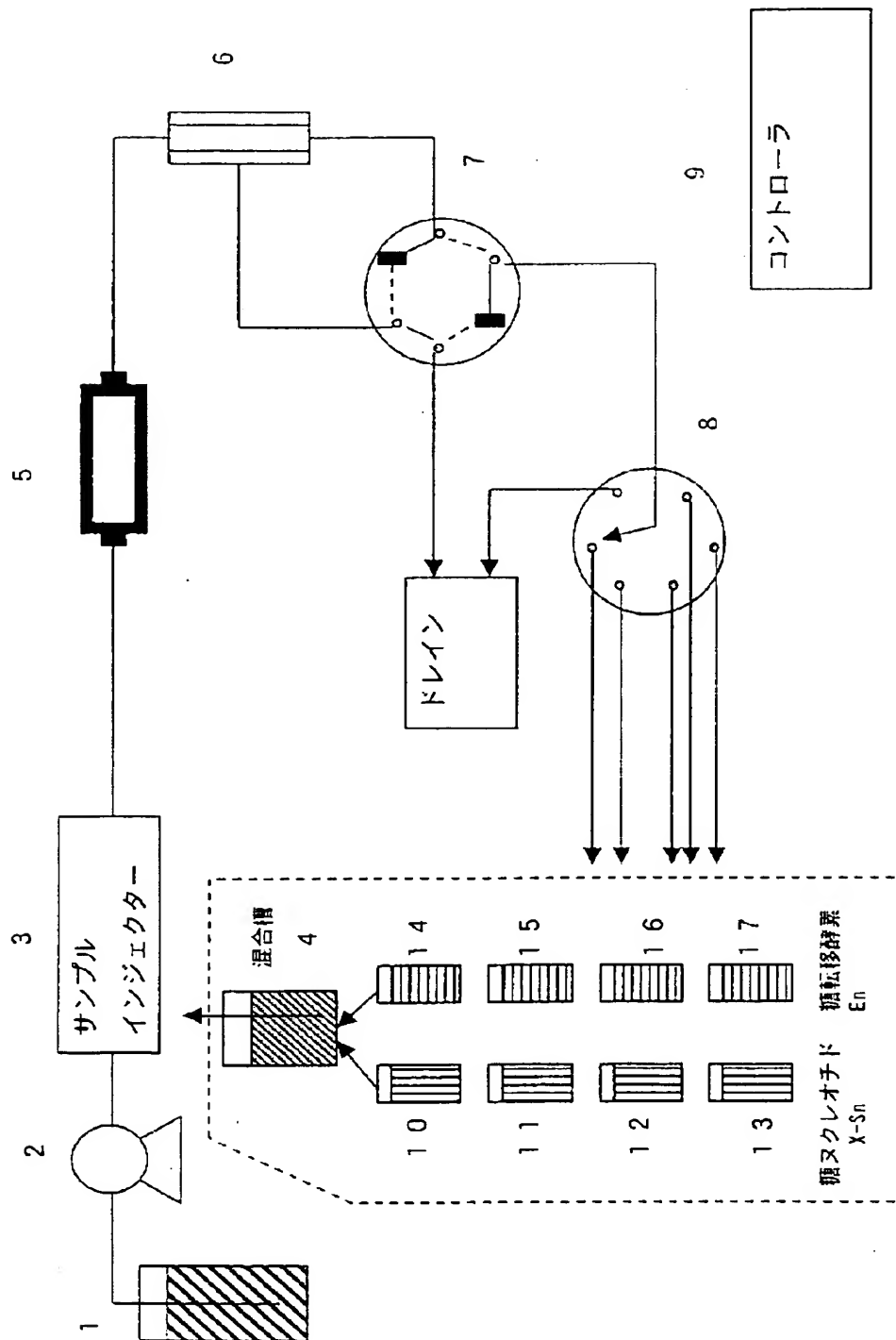
【符号の説明】

1…バッファー、2…ポンプ、3…サンプルインジェクター、4…混合槽、6
…限外ろ過カラム、7…6 方バルブ、8…流路切替バルブ、9…コントローラ、
10～13…糖ヌクレオチド、14～17…糖転移酵素、18…リサイクル 6 方
バルブ、19…トラップボトル。

【書類名】 図面

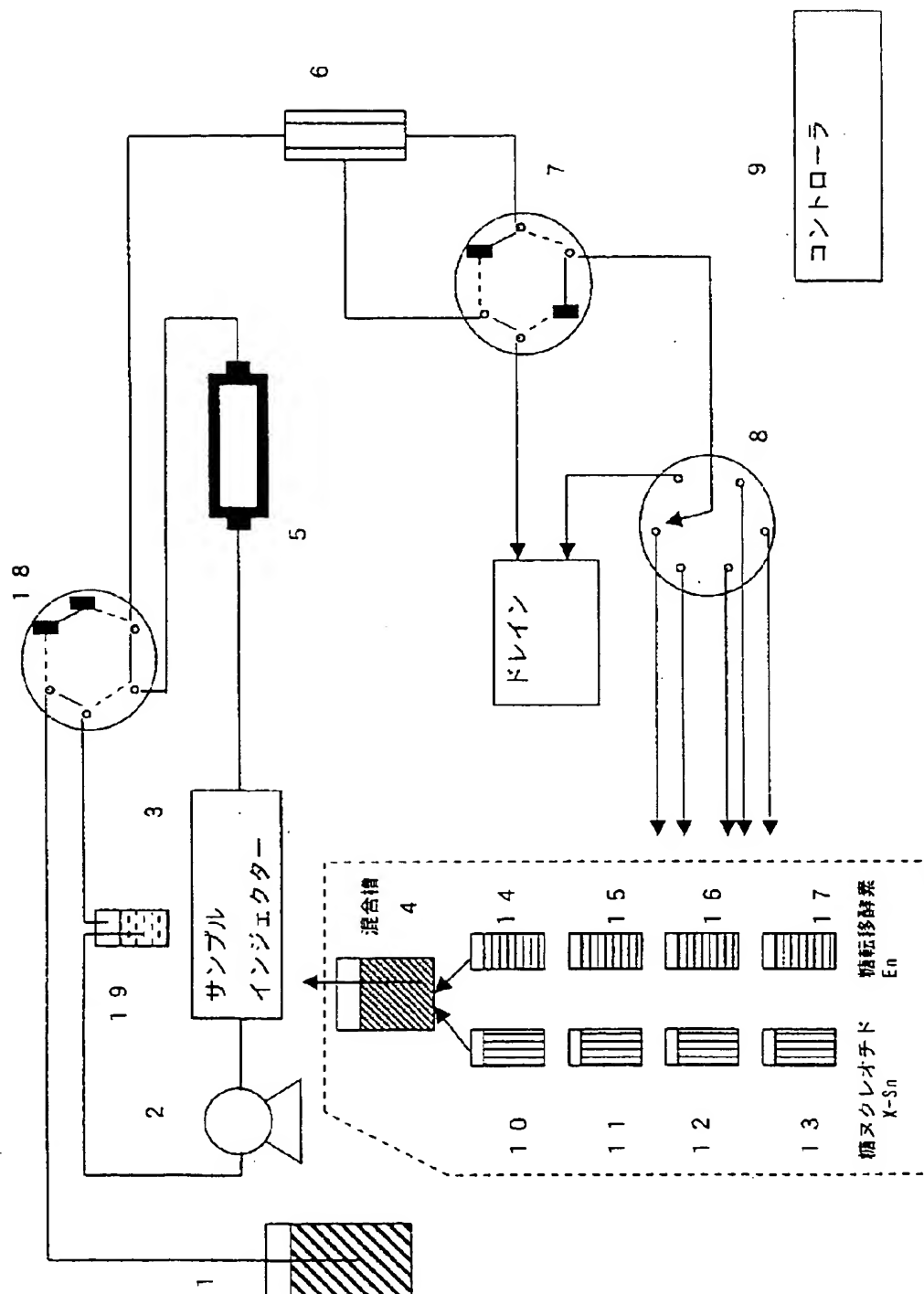
【図 1】

図 1



【図 2】

図 2



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】

複数の糖を順次反応させるとき、連続的に行える糖鎖合成装置を提供する。

【解決手段】

バッファー液を送液するためのポンプと、糖ヌクレオチド溶液と糖転移酵素を混合し前記バッファー液の流れる流路に注入するサンプルインジェクターと、プライマーが固定化され、且つ前記サンプルインジェクターから溶出した溶液と前記プライマーとを反応させる反応槽と、糖転移酵素と未反応の糖ヌクレオチドおよび反応生成物であるヌクレオチドとを分離するための限外ろ過カラムと、当該限外ろ過カラムに接続され、且つ糖転移酵素と未反応の糖ヌクレオチドおよび反応生成物であるヌクレオチドの流れる流路を切替える第1のバルブと、当該第1のバルブからの糖転移酵素の流れる流路を切替える第2のバルブを有することを特徴とする。

【効果】

複雑な糖鎖合成であっても連続的、且つ自動的に実行することが可能になる。

【選択図】 図1

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2 0 0 2 - 3 3 5 9 4 0
受付番号	5 0 2 0 1 7 4 8 8 3 7
書類名	特許願
担当官	塩原 啓三 2 4 0 4
作成日	平成 1 5 年 1 月 2 9 日

< 認定情報・付加情報 >

【提出日】	平成14年11月20日
-------	-------------

次頁無

特願 2 0 0 2 - 3 3 5 9 4 0

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[5 0 1 3 8 7 8 3 9]

1. 変更年月日

2 0 0 1 年 1 0 月 3 日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都港区西新橋一丁目 2 4 番 1 4 号

氏 名

株式会社日立ハイテクノロジーズ